

УДК: 612.354 + 612.397

## Влияние пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты в изолированных гепатоцитах крыс

Г.В.Стороженко, Н.А.Бабенко

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, НИИ биологии (Харьков, Украина)  
storojenko\_g@rambler.ru*

Изучали временную зависимость влияния пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты в изолированных гепатоцитах 3-месячных крыс. Показано, что через 3 часа после добавления пальмитиновой кислоты в среду культивирования клеток печени их жизнеспособность снижается по сравнению с контролем. Кроме того, установлено, что указанное снижение жизнеспособности гепатоцитов сопровождается падением уровня кардиолипина и увеличением содержания фосфатидной кислоты в гепатоцитах 3-месячных крыс по сравнению с клетками печени в контроле.

**Ключевые слова:** кардиолипин, пальмитиновая кислота, гепатоциты крыс.

## Вплив пальмітинової кислоти на вміст кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в ізолюваних гепатоцитах щурів

Г.В.Стороженко, Н.О.Бабенко

Вивчали залежність від часу впливу пальмітинової кислоти на вміст кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в ізолюваних гепатоцитах 3-місячних щурів. Показано, що через 3 години після додавання пальмітинової кислоти до середовища культивування клітин печінки їх життєздатність знижується у порівнянні з контролем. Крім того, встановлено, що вказане зниження життєздатності гепатоцитів після інкубування протягом 3 годин із пальмітиною кислотою супроводжується падінням рівня кардіоліпіну та зростанням вмісту фосфатидної кислоти в гепатоцитах 3-місячних щурів у порівнянні із клітинами печінки контролю.

**Ключові слова:** кардіоліпін, пальмітинова кислота, гепатоцити щурів.

## Cardiolipin and phosphatic acid content in rats hepatocytes, exposed to palmitic acid

G.V.Storozhenko, N.A.Babenko

Cardiolipin and phosphatic acid contents in the hepatocytes, isolated from the liver of 3-month-old rats, under exposure to palmitic acid were investigated. It has been determined, that addition of exogenous palmitic acid to the hepatocyte culture medium reduces the cell viability after 3-hour incubation as compared with control. Furthermore, it has been shown that hepatocyte viability decreases in the presence of palmitic acid and is accompanied with cardiolipin content reduction and increase of phosphatic acid content in hepatocytes as compared with control cells.

**Key words:** cardiolipin, palmitic acid, rats hepatocytes.

### Введение

Известно, что пальмитиновая кислота, добавляемая экзогенно в среду культивирования, способна индуцировать апоптоз в различных типах клеток (Ostrander et al., 2001; Itturalde et al., 2003; Sparagna et al., 2001; Blazquez et al., 2000; Hardy et al., 2003). С одной стороны, пальмитиновая кислота усиливает продукцию оксидантов благодаря блокаде комплекса III церамидом, а, с другой стороны, снижает активность комплекса IV респираторной цепи митохондрий. Однако тонкие механизмы индукции клеточной гибели пальмитатом остаются не до конца выясненными. Некоторые исследователи предполагают, что избыток пальмитата вызывает гибель клеток путем увеличения внутриклеточной концентрации церамидов (Paumen et al., 1997; Shimabukuro et al., 1998). С другой стороны, Y.Weі и сотрудниками показано, что пальмитат-индуцированный апоптоз может совершаться и независимыми от церамида путями (Wei et al., 2006). В ряде современных работ показано, что апоптоз, индуцированный пальмитатом, реализуется за счет образования активных форм кислорода (Listenberger et al., 2001), которые в свою очередь приводят к повреждению липидов мембран и запуску апоптоза (Владимиров и др., 2006а). В то же время, показано, что воздействие пальмитиновой кислотой вызывает митохондриально-опосредованный апоптоз гепатоцитов крыс

(Ji et al., 2005). Кардиолипин (КЛ) – основной митохондриальный липид, который выполняет важную роль в регуляции функций митохондрий, благодаря взаимодействию с некоторыми важными белками внутренней мембраны митохондрий, включая анионные переносчики и комплексы респираторной цепи (Hoch, 1992; Paradies et al., 2004; McMillin, Dowhan, 2002; Милейковская и др., 2005). Предполагается, что пероксидация КЛ, катализируемая цитохромом с, начинает цепь событий, приводящих к выходу цитохрома с из митохондрий и запуску апоптоза (Владимиров и др., 2006а, 2006б). Таким образом, очевидна ключевая роль КЛ в выходе цитохрома с из митохондрий и запуске механизмов клеточной гибели.

Учитывая сказанное выше, а также тесную метаболическую связь КЛ и фосфатидной кислоты (ФК), целью настоящей работы явилось изучение влияния пальмитиновой кислоты на содержание КЛ и ФК в изолированных гепатоцитах 3-месячных крыс.

### Материал и методы

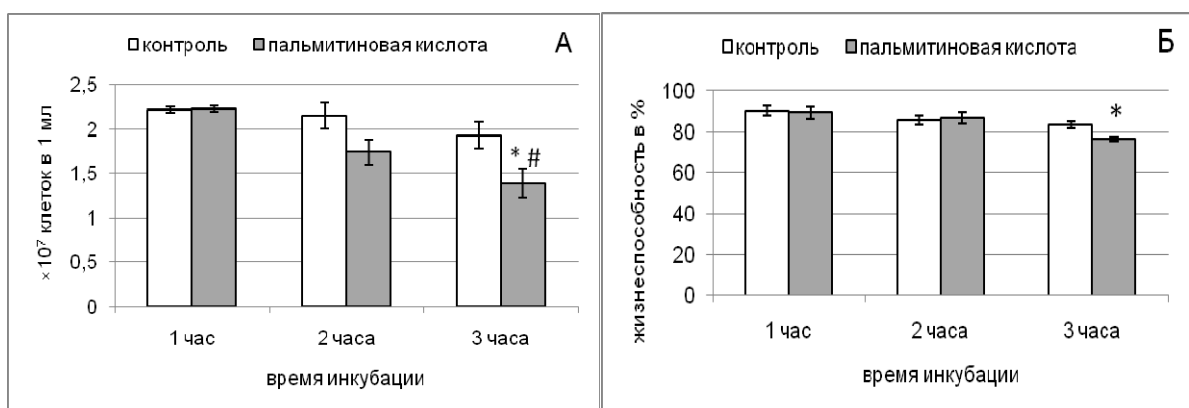
Гепатоциты 3-месячных крыс-самцов линии Вистар выделяли методом Петренко и соавторов (Петренко и др., 1991). Клетки инкубировали в среде 199 (Хенкса) (pH 7,5) с добавлением 12 mM HEPES и 1 mM дитиотрейтола в присутствии пальмитиновой кислоты (0,75 mM) в течение 3 часов при 37°C.

Жизнеспособность гепатоцитов после инкубации оценивали при помощи общепринятой методики окрашивания трипановым синим.

Экстракцию фосфолипидов из изолированных гепатоцитов осуществляли по методу Bligh, Dyer (Bligh, Dyer, 1959). Фракционирование индивидуальных представителей фосфолипидов производили методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (пластинки "Sorbfil", Россия) в системе растворителей – хлороформ : метанол : уксусная кислота : вода (80:12:8:0,3, по объему) (Биологические мембраны. Методы, 1990). Пятна липидов проявляли в парах йода и идентифицировали сравнением со стандартами. Количественное содержание фосфолипидов в хроматографических фракциях определяли по неорганическому фосфору (Bartlett, 1959), содержание нейтральных липидов – по March и Weinstein (March, Weinstein, 1966), содержание белка в пробах – методом Lowry и соавторов (Lowry et al., 1951). Результаты экспериментов представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка. Для сравнения использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Установлено, что после инкубации гепатоцитов в течение 3 часов с экзогенной пальмитиновой кислотой (0,75 mM) наблюдается снижение количества гепатоцитов, как относительно контроля, так и по сравнению с гепатоцитами, инкубированными в течение 1 часа с пальмитиновой кислотой (рис. 1А). Кроме того, через 3 часа после добавления пальмитиновой кислоты отмечалось снижение жизнеспособности гепатоцитов на 8% по сравнению с клетками печени в контроле (рис. 1Б).



**Рис. 1. Влияние пальмитиновой кислоты на количество гепатоцитов 3-месячных крыс (А) и их жизнеспособность (Б)**

*Примечание: \* – различия достоверны относительно соответствующей контрольной группы,  $p < 0,05$ ; # – различия достоверны по сравнению с 1-часовым воздействием,  $p < 0,05$ .*

Таким образом, добавление экзогенной пальмитиновой кислоты в среду культивации гепатоцитов 3-месячных крыс приводило к снижению количества гепатоцитов и их жизнеспособности с увеличением времени инкубации. Известно, что длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты снижают жизнеспособность и индуцируют апоптоз в клетках различных типов. Так, отмечается, что экзогенно добавленная пальмитиновая кислота снижает мембранный потенциал митохондрий и вызывает апоптоз в культуре клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 (Hardy et al., 2003). Индукция апоптоза насыщенными жирными кислотами также наблюдалась в опытах на кардиомиоцитах (Sparagna et al., 2001; Kong, Rabkin, 2002), астроцитах (Blazquez et al., 2000) и гепатоцитах (Han et al., 2008).

В последние годы появляется все больше данных, доказывающих, что эффекты перекисного окисления липидов лежат в основе многих повреждающих механизмов, включая повреждение мембран и встроенных в них ферментных систем. В настоящее время воздействие активных форм кислорода (АФК) считают универсальным механизмом повреждения как белковых, так и липидных компонентов мембраны. В нормальных условиях допустимый уровень АФК в митохондриях поддерживается развитой системой защиты, включающей цитохромоксидазу, супероксиддисмутазу и глутатионпероксидазу и др. Если же концентрация АФК продолжает нарастать, происходит открытие РТР (permeability transition pore), с выходом в цитоплазму АФК и цитохрома с, что сдерживает дальнейшую генерацию АФК. Продолжение открытия РТР при избытке АФК вызывает гибель митохондрий (называемую «митоптозом»), которая, за счет выхода митохондриальных белков (цитохрома с, АИФ), может привести к апоптозу или (при нехватке АТФ) к некрозу (Ипатова, 2005). Известно, что цитохром с электростатически и гидрофобно связан с внутренней мембраной митохондрии через КЛ, и снижение уровня этого фосфолипида приводит к высвобождению цитохрома с в цитоплазму и запуску апоптоза.

Рядом исследователей было показано, что апоптоз, вызываемый пальмитиновой кислотой, сопровождается снижением уровня КЛ в неонатальных кардиомиоцитах крыс (Ostrander et al., 2001) и в культуре клеток рака молочной железы (Hardy et al., 2003). Причем, S.Hardy и сотрудниками было показано, что пальмитат вызывает раннее усиление обмена КЛ в культуре клеток рака молочной железы и последующее снижение уровня этого митохондриального фосфолипида (Hardy et al., 2003). В настоящее время показано, что содержание КЛ в мембране становится критическим фактором для функционирования митохондрий при таких стрессовых состояниях, как температурный шок, субстратное голодание и окислительный стресс (Милейковская и др., 2005). Так, КЛ снижается в сердце при ишемии, при старении, а также в условиях, которые ведут к снижению митохондриальной респираторной функции (McMillin, Dowhan, 2002).

Нашими исследованиями показано, что действие пальмитиновой кислоты на гепатоциты 3-месячных крыс приводило к снижению содержания КЛ относительно контроля, причем этот эффект усиливался с увеличением времени инкубации (табл. 1).

**Таблица 1.**  
**Влияние пальмитиновой кислоты на содержание КЛ в гепатоцитах 3-месячных крыс**

Время инкубации (часы)	Контроль	Пальмитиновая кислота
1	7,58±1,20	6,63±1,18
2	7,56±1,11	2,40±0,59 * #
3	6,17±1,09	1,14±0,42 * #

*Примечания: \* – различия достоверны относительно соответствующей контрольной группы,  $p < 0,05$ ; # – различия достоверны по сравнению с 1-часовым воздействием,  $p < 0,05$ . Данные представлены в % от суммарных фосфолипидов.*

Таким образом, очевидно, что изменение содержания КЛ наблюдается уже после инкубации с пальмитиновой кислотой в течение 2 часов, когда еще не наблюдается снижение жизнеспособности гепатоцитов и их количества. Учитывая то, что КЛ необходим клетке для поддержания её функциональной активности, снижение содержания этого липида в гепатоцитах при действии пальмитиновой кислоты может предшествовать снижению жизнеспособности клеток.

В настоящее время G.M.Hatch и сотрудниками показано, что наличие амфифильных молекул может ослаблять биосинтез КЛ, что и наблюдается при повышенных концентрациях длинноцепочечных жирных кислот (Hatch, 1996). Предшественником синтеза КЛ в клетках является ФК, которая при помощи CDP-DAG-синтазы превращается в CDP-диацилглицерол и пиррофосфат. После этого фосфатидилглицерофосфат-синтаза катализирует образование

фосфатидилглицерофосфата из CDP-диацилглицерола и sn-глицерол-3-фосфата. Затем фосфатидилглицерофосфат дефосфорилируется в фосфатидилглицерол при помощи фосфатидилглицерофосфатазы. И, наконец, кардиолипин-синтаза катализирует конденсацию CDP-диацилглицерола и фосфатидилглицерола с образованием КЛ. Учитывая то, что ФК занимает центральное место в обмене фосфолипидов в различных тканях и клетках и является предшественником в синтезе КЛ, в нашем эксперименте мы исследовали изменение содержания ФК в гепатоцитах крыс наряду с исследованием содержания КЛ. Установлено, что пальмитиновая кислота приводила к существенному возрастанию относительного содержания ФК уже в течение первого часа инкубации клеток по сравнению с контролем (табл. 2).

**Таблица 2.**

**Влияние пальмитиновой кислоты на содержание ФК в гепатоцитах 3-месячных крыс**

Время инкубации (часы)	Контроль	Пальмитиновая кислота
1	3,76±0,81	6,98±0,80 *
2	3,89±0,96	8,32±0,79 *
3	3,60±1,18	9,07±0,75 *

*Примечания: \* – различия достоверны относительно соответствующей контрольной группы,  $p < 0,05$ . Данные представлены в % от суммарных фосфолипидов.*

Накопление ФК, индуцированное пальмитатом на фоне снижения содержания в клетках КЛ, может свидетельствовать о торможении в данных условиях эксперимента синтеза последнего. Причем возрастание содержания ФК наблюдается уже после 1 часа инкубации клеток с пальмитиновой кислотой, когда снижение уровня КЛ еще незначительно. Таким образом, можно предположить, что увеличение содержания ФК при действии пальмитата предшествует падению уровня КЛ в клетках печени.

### Выводы

Исследования временной зависимости воздействия пальмитиновой кислоты на содержание КЛ и ФК в гепатоцитах показало, что снижению содержания КЛ предшествует увеличение содержания его источника – ФК. В то же время, падение уровня КЛ в гепатоцитах при действии пальмитиновой кислоты предшествует снижению количества гепатоцитов и их жизнеспособности. Индуцированные пальмитатом изменения содержания КЛ и ФК в гепатоцитах крыс можно интерпретировать как ранние изменения в клетках, приводящие в конечном итоге к снижению их жизнеспособности.

### Список литературы

- Биологические мембраны. Методы / Пер. с англ. Под ред. Дж.Б.Финдлея, У.Г.Эванза. – М.: Мир, 1990. – 424с.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. и др. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином // Биохимия. – 2006а. – Т.71, вып.9. – С. 1215–1224.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. и др. Кардиолипин активирует пероксидазную активность цитохрома с, потому что увеличивает доступность железа гема для  $H_2O_2$  // Биохимия. – 2006б. – Т.71, вып.9. – С. 1225–1233.
- Ипатова О.М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. – Москва, 2005. – 318с.
- Милейковская Е., Жанг М., Доухан В. Роль кардиолипина в энергозапасующих мембранах // Биохимия. – 2005. – Т.70, вып.2. – С. 191–196.
- Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия. – 1991. – Т.56, вып.9. – С. 1647–1651.
- Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography // J. Biol. Chem. – 1959. – Vol.234, №3. – P. 466–468.
- Blazquez C., Galve-Roperh I., Guzman M. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase // FASEB. J. – 2000. – Vol.14. – P. 2315–2322.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – Vol.37, №8. – С. 911–917.
- Han M.S., Park S.Y., Shinzawa K. et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes // Journal of Lipid Research. – 2008. – Vol.49. – P. 84–97.
- Hardy S., El-Assaad W., Przybytkowski E. et al. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol.278, №34. – P. 31861–31870.

- Hatch G.M. Regulation of cardiolipin synthesis in the heart // *Mol. Cell. Biochem.* – 1996. – Vol.159. – P. 139–148.
- Hoch F.L. Cardiolipins and biomembrane function // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol.1113. – P. 71–133.
- Iturralde M., Gamen S., Pardo J., Bosque A. Saturated free fatty acid release and intracellular ceramide generation during apoptosis induction are closely related processes // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol.1634. – P. 40–51.
- Ji J., Zhang L., Wang P. et al. Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2005. – Vol.56. – P. 369–376.
- Kong J.Y., Rabkin S.W. Palmitate-induced cardiac apoptosis is mediated through CPT-1 but not influenced by glucose and insulin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol.282. – P. H717–H725.
- Listenberger L.L., Ory D.S., Schaffer J.E. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol.276. – P. 14890–14895.
- Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193. – P. 365–375.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* – 1966. – Vol.7, №4. – P. 574–580.
- McMillin J.B., Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol.1585. – P. 97–107.
- Ostrander D.B., Sparagna G.C., Amoscato A.A. et al. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol.276. – P. 38061–38067.
- Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M. et al. Decrease in mitochondrial complex 1 activity in ischemic/reperfused rat heart. Involvement of reactive oxygen species and cardiolipin // *Circ. Res.* – 2004. – Vol.94. – P. 53–59.
- Paumen M.B., Ishida Y., Muramatsu M. et al. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1 augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol.272. – P. 3324–3329.
- Shimabukuro M., Zhou Y.T., Levi M., Unger R.H. Fatty acid-induced  $\beta$  cell apoptosis: A link between obesity and diabetes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – Vol.95. Issue 5. – P. 2498–2502.
- Sparagna G.C., Hickson-Bick D.L., Buja L.M., McMillin J.B. Fatty acid-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes: redox signaling // *Antioxid. Redox Signal.* – 2001. – Vol.3, №1. – P. 71–79.
- Wei Y., Wang D., Topczewski F., Pagliassotti M.J. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol.291. – P. 275–281.

**Представлено: Л.О.Бондаренко / Presented by: L.O.Bondarenko**

**Рекомендовано до друку: В.А.Бондаренком / Recommended for publishing by: V.A.Bondarenko**

*Подано до редакції / Received: 18.01.2010.*

© Г.В.Стороженко, Н.О.Бабенко, 2010

© G.V.Storozhenko, N.A.Babenko, 2010